

**Autoradiographische in-vitro-Untersuchungen
zur Bestimmung des Mitose-Index und des
Markierungs-Index an menschlichen
Gaumenschleimhaut-Biopsien,**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Etzbach

Düsseldorf 1980

Aus der poliklinischen und zahnärztlich-chirurgischen Abteilung-
Parodontologie- der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund- und
Kieferkrankheiten.

(Direktor: Prof. Dr. M. Straßburg)

Westdeutsche Kieferklinik der Medizinischen Einrichtungen der
Universität Düsseldorf.

**Autoradiographische in-vitro-Untersuchungen
zur Bestimmung des Mitose-Index und des
Markierungs-Index an menschlichen
Gaumenschleimhaut-Biopsien,**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Etzbach

Düsseldorf 1980

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.

Prof. Dr. Krüskemper

Referent:

gez.

Prof. Dr. Herforth

Korreferent:

gez.

Prof. Dr. Borchard



Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

1.1	Ziel der autoradiographischen Untersuchung	1
1.2	Zellzyklus	4
1.3	Inkubationsmethoden	6
1.4	Geschichte der Autoradiographie	7
1.5	Grundlagen der Autoradiographie	8

2. Material und Methoden

2.1	Biopsieentnahme	9
2.2	Aufbereitung der Gewebeproben	10
2.2.1	nicht inkubierte Gewebeprobe	10
2.2.2	Inkubationsverfahren A	11
2.2.3	Inkubationsverfahren B	11
2.2.4	Herstellung der Autoradiogramme	12
2.3	Auswertung	13
2.3.1	Mitose-Index	13
2.3.2	Markierungs-Index	14
2.3.3	Statistik	14

3.	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	Histologie	
3.1.1	nicht inkubierte Gewebeprobe	16
3.1.2	A-inkubierte Biopsie	16
3.1.3	B-inkubierte Biopsie	17
3.2	Mittelwertvergleiche	
3.2.1	nicht inkubierte Histologie - A-Histologie	18
3.2.2	A-Histologie - B-Histologie	19
3.2.3	nicht inkubierte Histologie - B-Histologie	20
3.3	Autoradiogramme	
3.3.1	A-Autoradiogramme	21
3.3.2	B-Autoradiogramme	21
3.3.3	Mittelwertvergleich	22
4.	<u>Diskussion</u>	23
5.	<u>Zusammenfassung</u>	28
6.	<u>Tabellen</u>	30
7.	<u>Abbildungen</u>	38
8.	<u>Literatur</u>	43

1. Einleitung

1.1 Ziel der autoradiographischen Untersuchung

Die Gaumenschleimhaut zählt durch die fortlaufende mechanische Belastung beim Essen, Trinken und Sprechen zu den mit am höchsten belasteten menschlichen Epithelgeweben. Als Ausdruck der funktionellen Belastung finden wir einen besonderen feingeweblichen Aufbau: Reteleisten, Parakeratinisierung und Keratinisierung. Einen ähnlichen Aufbau finden wir bei der gesamten mastikatorischen Schleimhaut. (12)

Jedes Gewebe ist ein Verband von Zellen mit gleicher Aufgabe und gleicher Differenzierung. Auf Grund unterschiedlicher Aufgaben und Belastungen finden wir in den einzelnen Geweben eine unterschiedliche Zellaktivität. (11)

Da in der Chirurgie heute Transplantationen eine große Rolle spielen, stellt sich allgemein die Frage, ob das transplantierte Gewebe seine spezifische Zellaktivität beibehält, oder ob sich die Zellaktivität des Transplantates der neuen Umgebung anpaßt.

In der Parodontalchirurgie wird bei mucogingival-chirurgischen Eingriffen zur Verbreiterung der Gingiva propria heute wegen der besseren Operationsergebnisse verstärkt Gaumenschleimhaut transplantiert.

Bei Untersuchungen über transplantierte Alveolarmucosa (7), die die Aufgabe der Gingiva übernehmen sollte, zeigte sich, daß das Transplantat nicht nur seine ursprünglichen Charakteristika beibehielt, sondern auch noch abnorme Veränderungen im Epithel auftraten. (17)

Auch vorhergehende Untersuchungen (14, 15, 16) bestätigen, daß ein ausdifferenziertes Gewebe nach der Transplantation seine Charakteristika beibehält. Aus diesem Grunde sollte bei Transplantationen im Mundbereich darauf geachtet werden, daß das Transplantat im histologischen Aufbau dem Gewebe am Transplantationsort so ähnlich wie möglich ist. (16)

Diese Voraussetzung erfüllen die Gaumenschleimhauttransplantate aus dem harten Gaumen für die oben beschriebenen parodontal-chirurgischen Eingriffe, da sie einen fast identischen Aufbau besitzen wie die Gingiva propria. (Abb. 4)

Da es sich bei diesem Problem um einen umfangreichen Fragenkomplex handelt, dient die vorliegende Arbeit der Untersuchung der spezifischen Zellaktivität der Gaumenschleimhaut vor der Transplantation und der Untersuchung der besten Inkubations-Methoden für das Vorgehen bei weiteren Untersuchungen.

Für diese Untersuchungen mit verschiedenen Inkubationsverfahren bot sich die Autoradiographie an, die Untersuchungen von Stoffwechselvorgängen in zellulären und subzellulären Bereichen ermöglicht unter Erhalt der Zellstruktur. (1)

Da am Menschen in-vivo-Untersuchungen mit radioaktivem Material auf Grund der Strahlenbelastung nur in sehr beschränktem Umfang möglich sind, wurden verschiedene in-vitro Methoden angewendet und die Ergebnisse miteinander verglichen.

1.2 Zellzyklus

Jede Zelle durchläuft von ihrer Entstehung bis zu ihrer Teilung einen Intermitosezyklus oder Interphase. (13)

Diesen unterteilt man in

G_1 -Phase

S -Phase

G_2 -Phase

Mitose

Die G_1 -Phase ist die Wachstumsphase der Zelle nach vorausgegangener Zellteilung. Die Zelle bildet wieder Zellorganellen, Enzyme werden aktiviert und die Zelle nimmt nach ihrer Differenzierung ihre spezifische "Zellarbeit" auf.

Die G_1 -Phase ist die Zellphase mit der größten Varianz in der Dauer. Die Verweildauer der Zelle in der G_1 -Phase kann zwischen Stunden und Wochen, ja sogar Jahren (Haarfollikel), schwanken.

In der S-Phase, die etwa 7-16 Stunden, je nach Zellart (11), dauert, erfolgt die identische Replikation der DNS. Bietet man der Zelle in dieser Phase radioaktiv dotiert Nucleinsäuren an, z.B. H^3 -Thymidin, so wird dieses in die sich neu bildende DNS eingebaut und kann dann in Autoradiogrammen sichtbar gemacht und nachgewiesen werden. Durch Doppelmarkierungen in zeitlichen Abständen konnte die Dauer der S-Phase und anderer Teil-Phasen der Zelle im

Tierexperiment genau bestimmt werden. (3,5,6,9)
 Auf die S-Phase folgt die G_2 -Phase als prämitotische Ruhephase. Die Dauer der G_2 -Phase beträgt 40-180 min. (11)

Nach der G_2 -Phase tritt die Zelle in die Mitose ein und teilt sich. Die Mitose-Phasen sind die einzelnen, lichtmikroskopisch verifizierbaren Bilder für einen ablaufenden Generationszyklus der Zellen. Durch Umwelteinflüsse, z.B. Temperaturschock, lassen sich jedoch Mitosen auslösen. (13)

Die Mitose selbst dauert etwa 60-120 min. Sie ist in verschiedene Abschnitte unterteilt (10):

Prophase: Verdichtung der Kernsubstanz

Metaphase: Ordnung der Chromosomen für die Verteilung auf die Tochterzellen

Anaphase: Teilung der Chromosomen

Telophase: Bildung der neuen Kernhüllen,
 Teilung des Zellkörpers

Danach tritt die Zelle wieder in die G_1 -Phase ein und der Zyklus kann von neuem beginnen.

(Abb. 5, 6, 7, 8)

1.3 Inkubationsmethoden

Bei in-vitro-Untersuchungen sollen Gewebeschnitte im Inkubationsmedium möglichst ohne Änderung der Zellaktivität oder gar Schädigung in der Struktur weiterleben. Das stellt bestimmte Anforderungen an die Zusammensetzung und die Temperatur des Inkubationsmediums (9), hauptsächlich muß aber die Sauerstoffversorgung der Gewebeprobe gewährleistet sein. Der Sauerstoffbedarf richtet sich nach der Aktivität, die Sauerstoffaufnahme nach der Konsistenz des Gewebes.

Lockere Gewebeproben, z.B. Hodenzupfpräparate (3), nehmen den Sauerstoff durch die große Oberfläche leichter per diffusionem aus dem Nährmedium als kompakte Gewebeproben. (2)

Bei festen Gewebeschnitten, z.B. Mucosa, sollte um die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, mit Druck inkubiert werden.

Da für die Gaumenschleimhaut keine Untersuchungen vorliegen, standen somit zwei durchaus bewährte Inkubationsmethoden zur Auswahl. Um eindeutige Aussagen machen zu können, wurden beide Methoden angewandt (siehe 2.2.2 und 2.2.3) und die Ergebnisse miteinander verglichen.

1.4 Geschichte der Autoradiographie

Bereits zu Beginn des Jahrhunderts wurde die photographische Platte zum Nachweis natürlicher Radioaktivität im tierischen Gewebe benutzt. (LONDON, 1904, LACASSAGNE und LATTES 1924) (bei 11)

Die große Bedeutung der Autoradiographie für klinisch-experimentelle Untersuchungen setzte allerdings erst mit der Entwicklung künstlicher radioaktiver Isotope von biologisch interessanten Elementen ein.

Gleichzeitig wurden auch hochauflösende Spezialemulsionen für die Autoradiographie entwickelt, die den Fortschritt erst möglich machten.

Durch die Verwendung des sehr weichen β -Strahlers Tritium und Verwendung von feinstkörnigen Fotoemulsionen, die in Einkornschicht auf das Präparat aufgebracht werden, sind in Verbindung mit der Elektronenmikroskopie bei der Autoradiographie heute Aufösungen bis $0,1 \mu$ möglich.

1.5 Grundlagen der Autoradiographie

Jeder radioaktive Kern emittiert beim Zerfall Strahlung. Da es unterschiedliche Zerfallsarten gibt, unterscheidet man auch unterschiedliche Strahlung.

Bei α -Strahlern sendet der radioaktive Kern beim Zerfall positiv geladene Helium-Kerne aus.

Bei β -Strahlern werden negative (β^-) Elektronen oder positive (β^+) Positronen emittiert.

γ -Strahler kommen für die Autoradiographie praktisch nicht in Betracht, da die Absorptionswahrscheinlichkeit in der Fotoemulsion für γ -Quanten nahezu Null ist.

Bei K-Strahlern wird vom Kern meist ein Elektron der K-Schale absorbiert. Das Loch in der K-Schale wird durch ein anderes Elektron des Kerns aufgefüllt. Die entstehende Röntgenstrahlung wird fast vollständig durch Fotoeffekt absorbiert. Der zerfallende Kern sendet im Endeffekt energiearme Elektronen (Auger-Elektronen) aus, die eine Schwärzung in der Fotoemulsion hervorrufen. Auch K-Strahler sind für die Autoradiographie geeignet, da sie ähnliche Bilder wie β -Strahler erzeugen.

Die physikalischen und chemischen Vorgänge bei der Entstehung und Entwicklung autoradiographischer Bilder siehe Literatur. (1, 11)

2. Material und Methoden

2.1 Biopsieentnahme

Bei 10 Patienten, bei denen wegen einer Parodontalerkrankung zur Stabilisierung der marginalen Gingiva ein mucogingivaler Eingriff mit Vestibulumplastik und Deckung der Periost-Wundfläche durch ein Gaumenschleimhaut-Transplantat aus dem harten Gaumen indiziert war, wurden intra operationem von den Transplantaten Gewebeproben für die autoradiographische Untersuchung entnommen.

Es handelte sich um 7 weibliche und 3 männliche Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation zwischen 18 und 56 Jahren alt waren.



Abb. 1:

Entnahmestelle des Transplantates

Die Transplantate wurden unter Lokalanästhesie (Scandicain 3 % ohne Vasokonstringens) vom harten Gaumen entnommen. Die Entnahmestelle der Transplantate variierte zwischen rechts und links, die Entnahmezeit schwankte zwischen vormittags und nachmittags. Die genauen Daten siehe Tab. 1

Von diesen Transplantaten wurden intra operationem 2-3 ca. 1 mm breite Biopsien entnommen und sofort weiterverarbeitet.

2.2. Aufbereitung der Gewebeprobe

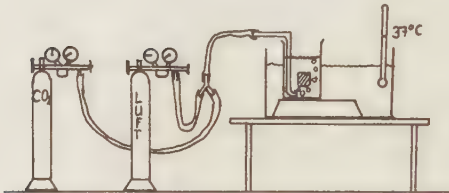


Abb. 2

Inkubationsverfahren A

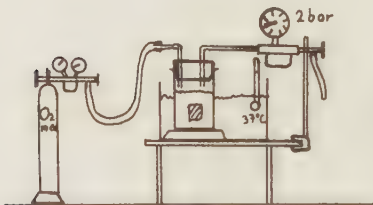


Abb. 3

Inkubationsverfahren B

Für die vorliegende Untersuchung wurden jeweils 3 Gewebeprobe benötigt.

2.2.1 nicht inkubierte Gewebeprobe

Eine Gewebeprobe wurde sofort nach Entnahme für mindestens 24 Std. in 4 % Formalin fixiert, um den Mitose-Index des Gewebes bei Entnahme feststellen zu können.

Nach der Vorbereitung wurden die Gewebestücke in Paraplast eingebettet und in 4 μ dicke Schnitte in Serie geschnitten. Danach wurden sie auf Objektträger montiert und mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. (8)

2.2.2 Biopsieinkubation: Verfahren A

Eine Gewebeprobe wurde sofort in Eagle-Medium eingebracht. Die Temperatur des Eagle-Medium betrug 37°C im Wasserbad (9). Beim Verfahren A wurde die Inkubationslösung unter atmosphärischen Bedingungen von einem Gemisch von Pressluft und 5 % CO₂ durchperlt. Als radioaktiver Prekursor wurde H³-Thymidin mit einer Aktivität von 300 μ Ci (0,3 ml/75 ml Lsg.) verwendet. Die Gewebeprobe wurde 30 min. inkubiert, danach dreimal in inaktivem Eagle-Medium gewaschen und anschließend für mindestens 24 Std. in 4 % Formalin fixiert.

2.2.3 Biopsieinkubation: Verfahren B

Eine weitere Gewebeprobe wurde ebenfalls sofort in 37°C warmem Eagle-Medium inkubiert. Im Unterschied zu Verfahren A wurde die Gewebeprobe im Verfahren B bei einem O₂-Überdruck von 2 bar inkubiert. Als radioaktiver Vorläufer diente H³-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 300 μ Ci (0,3 ml/75 ml Lsg.) Die Inkubationszeit betrug 30 min. Nach der Inkubation wurde die Gewebeprobe dreimal in inaktivem Eagle-Medium gewaschen und anschließend für 24 Std. in 4 % Formalin fixiert.

2.2.4 Herstellung der Autoradiogramme

Nach der Vorbereitung wurden die inkubierten Gewebestücke in Paraplast eingebettet und in Serie geschnitten. Die Schnittdicke betrug 4 μ . Nach der Montage auf Objektträger wurden die Präparate mit Hämatoxilin gefärbt. Auf eine Plasmafärbung mit Eosin wurde verzichtet, da es bei diesen Präparaten um eine Zuordnung von autoradiographischen Markierungen zu bestimmten Kernen ging.

Das Verfahren der Vorfärbung wurde trotz der Gefahr positiver chemographischer Effekte genommen, da es nicht um Silberkornzählung (= Anzahl der Silberkörner über einer Struktur) ging, sondern um das Auszählen markierter Zellen auf 1000 Zellen der Basalzellschicht. Nach der Färbung wurden die Präparate in der Dunkelkammer mit Ilford K2 Fotoemulsion im Tauchverfahren überzogen. Die Fotoemulsion Ilford K2 hat eine mittlere Korngröße von 0,2 μ und eine relativ hohe Empfindlichkeit. Die hohe Empfindlichkeit ist von Bedeutung, da H^3 -Thymidin ein schwacher β -Strahler ist, d.h. die emittierten β -Korpuskel sind relativ energiearm. Um in der Fotoemulsion trotzdem latente Bilder hervorrufen zu können, muß die Korngröße in der Emulsion sehr klein, die Empfindlichkeit aber sehr hoch sein.

Nachdem die Präparate mit Emulsion überzogen und getrocknet waren, wurden sie lichtdicht verpackt und im Kühlschrank exponiert. Die Expositionszeit betrug 14 Tage. Der Fortgang der Exposition wurde durch Kontrollentwicklungen festgestellt.

2.3. Auswertung

Pro Gewebe wurden 50 Schnitte à 4 μ hergestellt. Ausgezählt wurde jeder 4. Schnitt, um zu verhindern, daß dieselben Mitosen bzw. Markierungen mehrmals gezählt wurden. Gezählt wurde bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion.

Die photographische Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss-Fotomikroskop. Die Übersichtsaufnahme wurde mit 6,3facher Objektivergrößerung, die Abbildungen der Präparate zu einzelnen Verfahren mit 100facher Objektivergrößerung auf Kodak-Dokumentationsfilm 16 DIN aufgenommen.

2.3.1 Mitoseindex von inkubierten und nicht inkubierten Gewebeproben

Im Gegensatz zur tierischen oralen Schleimhaut, wo nur die basale Zellschicht zur Regeneration befähigt ist, ist bei menschlicher Mundschleimhaut die Basalzellschicht und 2-3 Suprabasalzelllagen zur Proliferation befähigt. (9) Aus diesem Grunde wurde eine Strecke von 1000 Zellen des Stratum germinativum (Basal + 2-3 Suprabasalzelllagen) gezählt. Zellaktivitäten, die in den 2-3 Suprabasalzelllagen sichtbar waren, wurden mitgezählt, wenn im mikroskopischen Bild eine Verbindung zur Basalmembran wahrscheinlich war.

Als Mitosen wurden alle Bilder von Kernen von der späten Prophase bis zur späten Telophase gezählt. (5) (Abb. 5, 6, 7, 8)

2.3.2 Markierungsindex

Bei den Autoradiogrammen wurde genauso verfahren und die markierten Zellen basal und suprabasal nach obenstehenden Kriterien ausgezählt. Als markiert wurden Zellen betrachtet, über deren Kernen mindestens 5 Silberkörner sichtbar waren. Die ausgezählten Ergebnisse wurden aber nicht nach Zelllagen getrennt aufgeführt. (6) (Tab. 2, 3)

2.3.3 Statistik

Die biomathematische Auswertung erfolgte nach dem t-Test (1). Der t-Test ist speziell für kleine Stichproben geeignet. Für den Test wurden folgende Werte benötigt:

n = Zahl der Meßwerte (Einzelvariablen)

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Einzelvariablen $n x$,

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$\sum x$ = alle Einzelvariablen addiert

$\sum x^2$ = alle Einzelvariablen quadriert und addiert

$(\sum x)^2$ = alle Einzelvariablen addiert und quadriert

Damit wurde die Streuung oder Standardabweichung s errechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}} \quad \text{oder} \quad s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - x(\sum x)}{n - 1}}$$

Die Werte für den t-Test siehe Tab. 4

Der Standardfehler wurde nach der Formel $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$ ermittelt.

Ein definierter Anteil von Werten liegt in Bereichen, die ein Vielfaches der Streuung s ausmachen, und zwar

95 % aller Werte im Bereich $\bar{x} - (1,96 \cdot s_x^-)$ bis $\bar{x} + (1,96 \cdot s_x^-)$
 99 % aller Werte im Bereich $\bar{x} - (2,58 \cdot s_x^-)$ bis $\bar{x} + (2,58 \cdot s_x^-)$
 99,9 % aller Werte im Bereich $\bar{x} - (3,29 \cdot s_x^-)$ bis $\bar{x} + (3,29 \cdot s_x^-)$

Um Signifikanzaussagen machen zu können, wurde beim Mittelwertvergleich die Irrtumswahrscheinlichkeit schrittweise gesenkt ($p = 5 \%$, $p = 1 \%$, $p = 0,1 \%$) d.h. die statistische Sicherheit von 95 % auf 99,9 % gesteigert. (Tab. 5, 6, 7)

Je kleiner man die Irrtumswahrscheinlichkeit wählt, desto größer wird der Standardfehler, den man berechnet. Stellt man bei kleiner Irrtumswahrscheinlichkeit aber noch signifikante Unterschiede fest, desto besser ist der Unterschied statistisch abgesichert. Bei biologischem Untersuchungsmaterial betrachtet man eine statistische Sicherheit von 95 % ($p = 5 \%$) noch als ausreichend. (1)

3. Ergebnisse

3.1 Histologie

3.3.1 nicht inkubierte Histologie

Bei der nicht inkubierten Histologie wurden die Präparate von 4 Patienten zugrunde gelegt. Ausgezählt wurden 4 mal 1000 Zellen. Der Mitose-Index bei den einzelnen Patienten schwankte zwischen 9,8 % und 10,9 %. (Tab. 2)

Das arithmetische Mittel ($\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$) ergibt 101,75 aktive Zellen auf 1000 Zellen, d.h. der Mitose-Index bei der nicht inkubierten Histologie beträgt 10,17 % (Tab. 2, 3). Nach den im Kap. 2.3.3 genannten Formeln liegen bei der nicht inkubierten Histologie

$$\begin{aligned}
 95 \% \quad \text{aller Werte zwischen } 101,75 \pm (1,96.2,49) \\
 &= 101,75 \pm 4,88 \\
 99 \% \quad \text{aller Werte zwischen } 101,75 \pm (2,58.2,49) \\
 &= 101,75 \pm 6,42 \\
 99,9 \% \quad \text{aller Werte zwischen } 101,75 \pm (3,29.2,49) \\
 &= 101,75 \pm 8,19
 \end{aligned}$$

3.1.2 A-Histologie

Bei der A-Histologie liegen die Zahlen von 9 Patienten zugrunde. Ausgezählt wurden 9 mal 1000 Zellen. Der Mitose-Index der A-Histologie schwankte bei den einzelnen Patienten zwischen 6,7 % und 10,3 %. Das arithmetische Mittel ergibt 82 aktive Zellen auf 1000 Zellen, d.h. der Mitose-Index nach A-Inkubation beträgt 8,2 %. (Tab. 2, 3)

Bei der A-Histologie liegen

95 %	aller Werte zwischen	$82 \pm (1,96.3,82)$
		$= 82 \pm 7,48$
99 %	aller Werte zwischen	$82 \pm (2,58.3,82)$
		$= 82 \pm 9,85$
99,9 %	aller Werte zwischen	$82 \pm (3,29.3,82)$
		$= 82 \pm 12,56$

3.1.3 B-Histologie

Bei der B-Histologie wurden die Präparate von 10 Patienten, d.h. 10 mal 1000 Zellen, ausgezählt. Der Mitose-Index schwankte relativ stark. Er lag zwischen 9,1 % und 14,7 %. Das arithmetische Mittel ergibt 113,8 aktive Zellen auf 1000 Zellen, d.h. der Mitose-Index bei der B-Histologie beträgt 11,38 %. (Tab. 2, 3)

Bei der B-Histologie liegen

95 %	aller Werte zwischen	$113,8 \pm (1,96.6,24)$
		$= 113,8 \pm 12,23$
99 %	aller Werte zwischen	$113,8 \pm (2,58.6,24)$
		$= 113,8 \pm 16,09$
99,9 %	aller Werte zwischen	$113,8 \pm (3,29.6,24)$
		$= 113,8 \pm 20,52$

3.2. Mittelwertvergleiche

3.2.1 nicht inkubierte Histologie

- A-Histologie

Nachdem die Mittelwerte der Mitose-Indices der verschiedenen Histologien errechnet waren, wurden sie, um Signifikanzaussagen machen zu können, miteinander verglichen. Beim Mittelwertvergleich wird der kleinere Wert plus Streuung und der größere Wert minus Streuung bei $p = 5 \%$, $p = 1 \%$ und $p = 0,1 \%$ einander gegenübergestellt und verglichen.

Ist ein Wert deutlich größer oder kleiner, so ist der Unterschied signifikant.

Beim Vergleich allgemeine Histologie mit der A-Histologie ergibt sich:

($\bar{x}_1$ = allg. Histo, $\bar{x}_2$ = A-Histo)

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_1(p=5\%) = 101,75 \pm 4,88 & \bar{x}_2(p=5\%) = 82 \pm 7,48 \\ & = 96,87 & = 89,48 \end{array}$$

Der Mitose-Index der nicht inkubierten Histologie ist deutlich größer als der Mitose-Index der A-Histologie. Der Unterschied bei $p = 5 \%$, d.h. bei 95 % stat. Sicherheit ist signifikant. (Tab. 5)

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_1(p=1\%) = 101,75 \pm 6,42 & \bar{x}_2(p=1\%) = 82 \pm 9,85 \\ & = 95,33 & = 91,85 \end{array}$$

Bei 99 % statistischer Sicherheit ($p = 1 \%$) ergibt sich für die nicht inkubierte Histologie noch ein deutlich größerer Wert. Der Unterschied ist signifikant. (Tab. 6)

$$\begin{aligned}\bar{x}_1(p=0,1\%) &= 101,75 \pm 8,19 & \bar{x}_2(p=0,1\%) &= 82 \pm 12,56 \\ &= 93,56 & &= 94,56\end{aligned}$$

Bei $p = 0,1 \%$ ist der Wert der A-Histologie größer als der kleinstmögliche Wert der nicht inkubierten Histologie. Damit liegt er im Vertrauensintervall von 101,75-8,19. Es besteht kein Unterschied mehr, da sich die Vertrauensintervalle überschneiden. (Tab. 7)

3.2.2 A-Histologie - B-Histologie

Der Mittelwertvergleich des Mitose-Index zwischen A-Histologie und B-Histologie erfolgte auf gleiche Weise. ($\bar{x}_1 = \text{A-Histo}$, $\bar{x}_2 = \text{B-Histo}$):

$$\begin{aligned}\bar{x}_1(p=5\%) &= 82 \pm 7,48 & \bar{x}_2(p=5\%) &= 113,8 \pm 12,23 \\ &= 89,48 & &= 101,57\end{aligned}$$

Der Wert der B-Histologie ist deutlich größer als der Wert der A-Histologie. Der Unterschied bei $p = 5 \%$ ist signifikant. (Tab. 5)

$$\begin{aligned}\bar{x}_1(p=1\%) &= 82 \pm 9,85 & \bar{x}_2(p=1\%) &= 113,8 \pm 15,09 \\ &= 91,85 & &= 97,71\end{aligned}$$

Auch bei $p = 1 \%$ ist der Unterschied zwischen A-Histologie und B-Histologie signifikant. (Tab. 6)

$$\begin{aligned}\bar{x}_1(p=0,1\%) &= 82 \pm 12,56 & \bar{x}_2(p=0,1\%) &= 113,8 \pm 20,52 \\ &= 94,56 & &= 93,28\end{aligned}$$

Bei der statistischen Sicherheit von 99,9 % überschneiden sich die Vertrauensintervalle von A-Histologie und B-Histologie. Es besteht kein Unterschied mehr. (Tab. 7)

3.2.3 nicht inkubierte Histologie - B-Histologie

Der Mittelwertvergleich zwischen nicht inkubierter Histologie und B-Histologie erfolgte auch auf die oben beschriebene Weise.

($\bar{x}_1$ = allg. Histo, $\bar{x}_2$ B-Histo)

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_1(p=5\%) = 101,75 \pm 4,88 & \bar{x}_2(p=5\%) = 113,8 \pm 12,23 \\ & = 106,63 \qquad \qquad \qquad = 101,47 \end{array}$$

Bereits bei einer statistischen Sicherheit von 95 % überschneiden sich die Vertrauensintervalle von nicht inkubierter Histologie und B-Histologie. Es besteht somit statistisch kein Unterschied im Mitose-Index zwischen normaler Histologie und der nach B-Inkubation angefertigten Histologie. (Tab. 5, 6, 7)

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich bei einer für biologisches Untersuchungsmaterial ausgezeichneten statistischen Sicherheit von 99 % die Mitose-Indices von nicht inkubierter Histologie und B-Histologie nicht voneinander unterscheiden, dagegen stellt man bei gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % signifikante Unterschiede zwischen nicht inkubierter Histologie und A-Histologie sowie zwischen A-Histologie und B-Histologie fest. (Tab. 5, 6, 7)

3.3. Autoradiogramme

3.3.1 A-Autoradiogramme

Den A-Autoradiogrammen liegen die Zahlen von 9 Patienten zugrunde. Ausgezählt wurden 9 mal 1000 Zellen (Tab. 2). Der Markierungs-Index schwankte zwischen 4,2 % und 9,9 %.

Das arithmetische Mittel ergibt 76,11 markierte Zellen auf 1000 Zellen. Der Markierungs-Index beträgt 7,61 %. (Tab. 2, 3)

Bei den A-Autoradiogrammen liegen

95 %	aller Werte zwischen	$76,11 \pm (1,96.4,94)$
		$= 76,11 \pm 9,68$
99 %	aller Werte zwischen	$76,11 \pm (2,58.4,94)$
		$= 76,11 \pm 12,74$
99,9 %	aller Werte zwischen	$76,11 \pm (3,29.4,94)$
		$= 76,11 \pm 16,25$

3.3.2 B-Autoradiogramme

Den B-Autoradiogrammen liegen die Zahlen von 9 Patienten zugrunde. Ausgezählt wurden 9 mal 1000 Zellen (Tab. 2). Der Markierungs-Index schwankt zwischen 11,4 % und 15,8 %. Das arithmetische Mittel ergibt 135,11 markierte Zellen auf 1000 Zellen. Der Markierungs-Index beträgt 13,51 %. (Tab. 2, 3)

Bei den B-Autoradiogrammen liegen

95 %	aller Werte zwischen	$135,11 \pm (1,96.5,18)$
		$= 135,11 \pm 10,15$
99 %	aller Werte zwischen	$135,11 \pm (2,58.5,18)$
		$= 135,11 \pm 13,36$
99,9 %	aller Werte zwischen	$135,11 \pm (3,29.5,18)$
		$= 135,11 \pm 17,04$

3.3.3 Mittelwertvergleich

Wie im Kap. 3.2, so wurden auch die Mittelwerte der A-Autoradiogramme und der B-Autoradiogramme mit fallender Irrtumswahrscheinlichkeit und steigender statistischer Sicherheit einander gegenübergestellt und verglichen.

$$(\bar{x}_1 = \text{A-Auto}, \bar{x}_2 = \text{B-Auto})$$

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_1 (p=5\%) = 76,11 \pm 9,68 & \bar{x}_2 (p=5\%) = 135,11 \pm 10,15 \\ & = 85,79 \qquad \qquad \qquad = 124,96 \end{array}$$

Der Unterschied im Markierungs-Index zwischen A-Autoradiogrammen und B-Autoradiogrammen ist signifikant. (Tab. 5)

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_1 (p=1\%) = 76,11 \pm 12,74 & \bar{x}_2 (p=1\%) = 135,11 \pm 13,36 \\ & = 88,85 \qquad \qquad \qquad = 121,75 \end{array}$$

Auch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von nur 1 % liegt die Obergrenze des Vertrauensintervalls der A-Autoradiogramme weit von der Untergrenze des Vertrauensintervalls der B-Autoradiogramme. Der Unterschied ist signifikant. (Tab. 6)

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_1 (p=0,1\%) = 76,11 \pm 16,25 & \bar{x}_2 (p=0,1\%) = 135,11 \pm 17,04 \\ & = 92,36 \qquad \qquad \qquad = 118,07 \end{array}$$

Auch bei einer statistischen Sicherheit von 99,9 % ist der Unterschied im Markierungs-Index zwischen A-Autoradiogrammen und B-Autoradiogrammen signifikant. (Tab. 7)

4. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung ist Teil eines Untersuchungskomplexes, der die Frage der Änderung der Zellkinetik bei transplantierte Gaumenschleimhaut klären soll.

Die vorliegende Arbeit dient der Feststellung der Zellaktivität vor der Transplantation und der Festlegung des besten methodischen Vorgehens für die weiteren Untersuchungen.

Die unterschiedlichen Entnahmezeiten der Gewebeproben wurden zwar vermerkt, (Tab. 1), in der vorliegenden Untersuchung wurde eine eventuelle tageszeitliche Schwankung der Mitoserate (7) jedoch nicht berücksichtigt.

Bei der Untersuchung des methodischen Vorgehens werden der Mitose-Index der nicht inkubierten Gewebeproben und die Mitose-Indices der verschieden inkubierten Gewebeproben sowie die Autoradiogramme der nach Methode A und B inkubierten Gewebeproben einander gegenübergestellt und verglichen.

Die Untersuchung ergibt keine statistischen Unterschiede im Mitose-Index zwischen nicht inkubierter Histologie und der B-Histologie, (Tab. 5, 6, 7), aber signifikante Unterschiede im Mitose-Index zwischen nicht inkubierter Histologie und A-Histologie sowie signifikante Unterschiede im Mitose-Index zwischen den unter atmosphärischen Bedingungen inkubierten Biopsien und den mit 2bar O₂-Überdruck inkubierten Biopsien. (Tab. 5, 6)

Ebenfalls signifikante Unterschiede bestehen zwischen den Markierungs-Indices von A-Autoradiogrammen und B-Autoradiogrammen. (Tab. 5, 6, 7) Die starke Streuung der Mitose-Indices bei den einzelnen Patienten (Tab. 2) hängt von der Erkennbarkeit der einzelnen Mitosephasen, besonders der Prophasenkerne, ab. (Abb. 5)

Bei der Betrachtung der prozentualen Unterschiede im Mitose-Index von nicht inkubierter Histologie, A-inkubierter Histologie und B-inkubierter Histologie fällt auf, daß der Wert der A-inkubierten Histologie deutlich, d.h. 20 % unter dem Wert der nicht inkubierten Histologie und 30 % unter dem der B-inkubierten Histologie liegt.

Noch deutlicher wird dieser Unterschied beim Vergleich der Markierungs-Indices der Autoradiogramme. Hier beträgt der Unterschied fast 50 % (genau 45,78 %).

Andererseits fällt die leichte Steigerung der Mitoserate bei den druckinkubierten histologischen Präparaten gegenüber der nicht inkubierten Histologie auf. Die Steigerung beträgt 10 %.

Eine Erklärung für diese Steigerung könnte die mechanische Irritation des Gewebes bei der Entnahme des Transplantates sein, da Umwelteinflüsse Mitosen auslösen können. (13)

Wenn bei der Histologie nach A-Inkubation eine solche Steigerung nicht sichtbar wird, so kann

dieses Absinken der Mitoserate durch die unterschiedlichen Inkubationsmethoden erklärt werden. Da bei der atmosphärischen Inkubation Sauerstoff und Nährstoffe nur per Diffusion in das Gewebe gelangen können, scheint die Versorgung der Zellen bei dieser Methode nicht gewährleistet zu sein. Das Absinken des O_2 -Partialdrucks zum Inneren der Gewebeprobe hin wird auch bei anderen Autoren erwähnt. (11)

Noch deutlicher wird dieser Unterschied beim Vergleich der Markierungs-Indices der Autoradiogramme. (Tab. 5, 6, 7)

Es scheint so, als ob bei atmosphärischer Inkubation keine Zellen die G_1 -Phase verlassen und in die S-Phase eintreten. Dadurch liegt der Markierungs-Index bei den A-Autoradiogrammen niedriger als erwartet. Er ist signifikant niedriger als der Markierungs-Index der B-Autoradiogramme.

Die Steigerung des Mitose-Index bei Druckinkubation, die im statistischen Mittelwertvergleich nicht auffällt, sondern nur bei direktem Vergleich der prozentualen Werte von nicht inkubierter Gewebeprobe und druckinkubierter Gewebeprobe deutlich wird, kann durch den Sauerstoffüberdruck im System erklärt werden. Es handelt sich hierbei um die schon erwähnten Umwelteinflüsse (13), zu denen ja auch ein höherer Sauerstoff-Partialdruck gehört, die für diese Steigerung verantwortlich zu sein scheinen.

Durch diesen "anabolen Effekt" der Druckinkubation ist die Steigerung des Markierungs-Index dadurch zu erklären, daß bei einem Überangebot von Nährstoff, in diesem Falle ein Überangebot von H^3 -Thymidin, und bei Sauerstoff-Überdruck mehr Zellen die G_1 -Phase, die ja sehr variabel in ihrer Dauer ist, verlassen und in die S-Phase eintreten. Wenn aber mehr Kerne die DNS-Synthese beginnen und radioaktives Material in die Kernsubstanz einbauen, muß das einen erhöhten Markierungs-Index in den Basal- und Suprabasalzellschichten hervorrufen.

Ebenfalls kann die Gewebsverletzung bei der Entnahme des Transplantates über einen sogenannten "feed-back-Mechanismus" durch Freisetzung von Gewebefaktoren für eine Steigerung der Mitoserate und damit für eine Erhöhung des Markierungs-Index verantwortlich sein.

Auch wenn bei der Auswertung nicht die Anzahl der Silberkörner über einem Kern gezählt wurden, sondern nur die Anzahl markierter Zellen der Zahl der nichtmarkierten Zellen gegenübergestellt wurde, so zeigen die Bilder der Autoradiogramme nach B-Inkubation eine deutlich dichtere Silberkornmarkierung als die Bilder der Autoradiogramme nach A-Inkubation. (Abb. 9, 10)

Das läßt auf eine deutlich größere Zellaktivität bei der Druckinkubation schließen.

Bei den weitergehenden Untersuchungen ist die Druckinkubationsmethode bei Untersuchungen von menschlichen Gaumenschleimhauttransplantaten der atmosphärischen Inkubation vorzuziehen. Die bei der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse zeigen m.E., daß die Zellaktivität der Gewebeproben während der Druckinkubation ohne nennenswerte Störungen weiterläuft. Dadurch lassen sich anscheinend die in-vitro gefundenen Ergebnisse mit nur geringer Fehlerquote auf in-vivo-Verhältnisse übertragen.

5. Zusammenfassung

Zur Abklärung der günstigsten Inkubationsmethode für autoradiographische in-vitro-Untersuchungen von menschlichen Gaumenschleimhaut-Biopsien wurden von 10 Patienten, 7 weiblichen und 3 männlichen, während eines muco-gingival-chirurgischen Eingriffs von einem Gaumenschleimhauttransplantat Gewebebiopsien entnommen und sofort entweder fixiert oder inkubiert.

Der Entnahmeort variierte zwischen rechts und links, die Entnahmezeit lag zwischen 9.00 und 15.00 Uhr.

Untersucht wurde der Mitose-Index der nicht inkubierten Gewebeprobe, der Mitose-Index der bei atmosphärischen Bedingungen inkubierten Gewebeprobe (A) und der Mitose-Index der druckinkubierten Gewebeprobe (B). Gleichzeitig wurden von den inkubierten Gewebeproben Autoradiogramme zur Bestimmung des Markierungs-Index hergestellt.

Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Mitose-Indices der nicht inkubierten Gewebebiopsie und der A-inkubierten Gewebeprobe und zwischen den Mitose-Indices der A-inkubierten Gewebeprobe und der B-inkubierten Gewebeprobe.

Keine Unterschiede zeigt der Vergleich zwischen den Mitose-Indices von nicht inkubierter Gewebeprobe und von der B-inkubierten Gewebebiopsie.

Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede zwischen den Markierungs-Indices von A-Auto-radiogrammen und B-Autoradiogrammen.

Die Untersuchungsergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Inkubationsmethode mit einem Sauerstoff-Überdruck von 2 bar für in-vitro-Untersuchungen von menschlicher Gaumenschleimhaut die Methode der Wahl ist, da die Zellen ihre spezifische Aktivität beibehalten und Zellvorgänge ungehindert weiterlaufen können.

Auch lassen sich die Ergebnisse anscheinend ohne große Fehlerquote auf in-vivo-Verhältnisse übertragen.

6. Tabellen

Tab. 1

Nr	lNr	Ges	Geb-Dat	Alt/Op	Ort	Zeit	His	A-His	B-His	A-Aut	B-Aut
1	40	♂	29.3.55	23 J.	6	9.30		X	X	X	X
2	41	♀	1.5.23	55 J.	6	10.00		X	X	X	X
3	42	♀	5.10.40	38 J.	6	10.00		X	X	X	X
4	43	♂	25.12.40	37 J.	6	15.00			X		X
5	44	♂	23.9.60	18 J.	7	11.00		X	X	X	X
6	45	♀	4.2.60	16 J.	6	9.30		X	X	X	X
7	46	♀	14.11.47	32 J.	6	10.00	X	X	X	X	X
8	47	♀	12.1.51	23 J.	6	9.00	X	X	X	X	X
9	48	♀	1.3.51	28 J.	6	9.00	X	X	X	X	
10	49	♀	14.10.45	34 J.	6	14.00	X	X	X	X	

Tab. 2

Nr	Histo			A-Histo			B-Histo			A-Auto			B-Auto		
	Zellen	Mi	%Mi	Zellen	Mi	%Mi	Zellen	Mi	%Mi	Zellen	mZ	%mZ	Zellen	mZ	%mZ
1				1000	78	7,8	1000	116	11,6	1000	90	9,9	1000	133	13,3
2				1000	77	7,7	1000	110	11,0	1000	71	7,1	1000	114	11,4
3				1000	90	9,0	1000	147	14,7	1000	93	9,3	1000	153	15,3
4							1000	99	9,9				1000	140	14,0
5				1000	93	9,3	1000	141	14,1	1000	76	7,6	1000	158	15,8
6				1000	82	8,2	1000	132	13,2	1000	73	7,3	1000	135	13,5
7	1000	101	10,1	1000	103	10,3	1000	101	10,1	1000	77	7,7	1000	120	12,0
8	1000	99	9,9	1000	70	7,0	1000	95	9,5	1000	42	4,2	1000	118	11,8
9	1000	109	10,9	1000	67	6,7	1000	106	10,6	1000	85	8,5	1000	145	14,5
10	1000	98	9,8	1000	78	7,8	1000	91	9,1	1000	78	7,8			

Tab. 3

Methoden	Anz Pat	Zellen	Mitosen markiert	% Ze
all.Histo	4	4000	407	10,17
A - Histo	9	9000	738	8,2
B - Histo	10	10000	1138	11,38
A - Auto	9	9000	685	7,61
B - Auto	9	9000	1216	13,51

Tab. 4

methode	n	Sx	$\bar{x}$	Sx^2	$(Sx)^2$	s	s^2	$s\bar{x}$
all. Histo	4	407	101,75	41487	165649	4,99	24,9	2,49
A - Histo	9	738	82	61568	544644	11,45	131,33	3,82
B - Histo	10	1138	113,8	133014	1295044	19,74	378,69	6,24
A - Auto	9	685	76,11	53897	469225	14,83	219,92	4,94
B - Auto	9	1216	135,11	166232	1478656	15,56	242,11	5,18

Tab. 5

Vergleich	$\bar{x}_1(p=5\%)$	$\bar{x}_2(p=5\%)$	Signifikanz
Allg. Histo			
A - Histo	96,87	> 89,48	ja
Allg. Histo			
B - Histo	101,75 ± 4,88	~ 113,8 ± 12,23	nein
A - Histo	89,48	< 101,57	ja
B - Histo			
A - Auto	85,79	< 124,96	ja
B - Auto			

Tab. 6

Vergleich	$\bar{x}_1(p=1\%)$	$\bar{x}_2(p=1\%)$	Signifikanz
Allg. Histo			
A - Histo	95,33	> 91,85	ja
Allg. Histo			
B - Histo	Mittelwerte $\pm$ Streuung deckungsgleich		nein
A - Histo			
B - Histo	91,85	< 97,71	ja
A - Auto			
B - Auto	88,85	< 121,75	ja

Tab. 7

Vergleich	$\bar{x}_1(p=0,1\%)$	$\bar{x}_2(p=0,1\%)$	Signifikanz
Allg. Histo			
A - Histo	93,56	~ 94,56	nein
Allg. Histo			
B - Histo	Mittelwerte gleich		nein
A - Histo			
B - Histo	94,56	~ 93,28	nein
A - Auto			
B - Auto	92,36	< 118,07	ja

7. Abbildungen



Abb. 4

Aufbau der Gaumenschleimhaut, Objektivvergrößerung 6,3fach

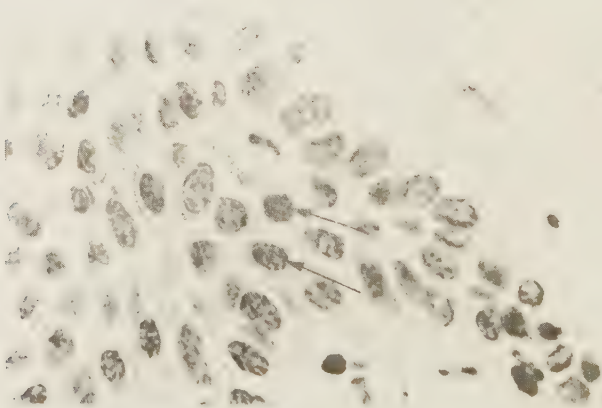


Abb. 5

Prophasenkerne (→)

Objektivvergrößerung 100fach
Ölimmersion

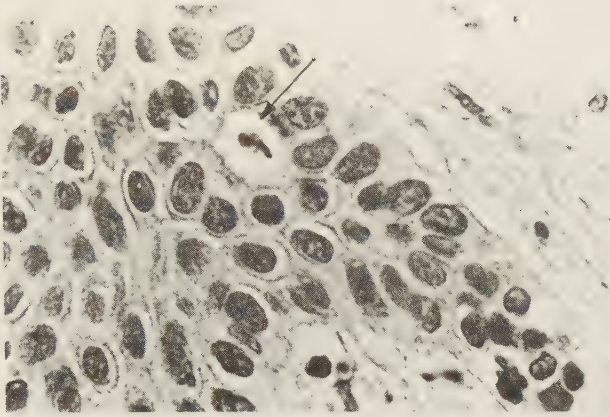


Abb. 6

Metaphasenkerne (→) Objektivvergrößerung 100fach
Ölimmersion

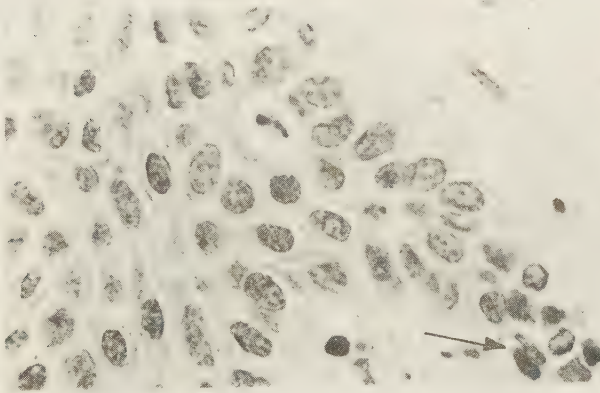


Abb. 7

Anaphasenkerne (→) Objektivvergrößerung 100fach
Ölimmersion

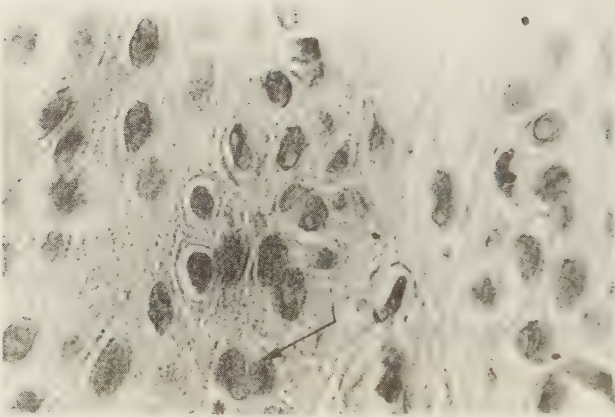


Abb. 8

Telophasenkerne (→) Objektivvergrößerung 100fach
Ölimmersion

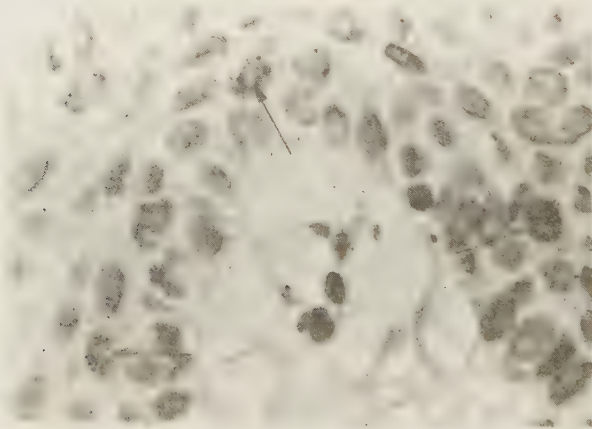


Abb. 9

Autoradiogramm nach Objektivvergrößerung 100fach
A-Inkubation Ölimmersion

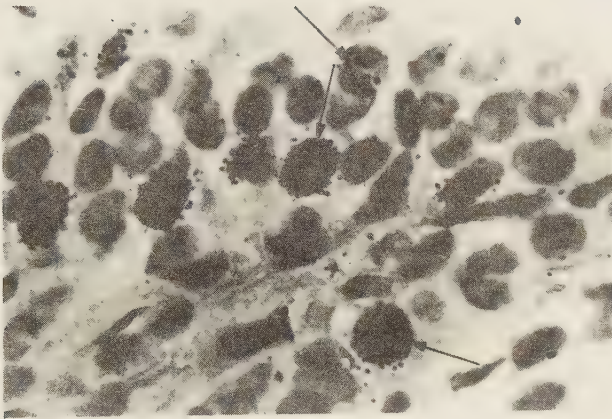


Abb. 10

Autoradiogramm nach
B-Inkubation

Objektivvergrößerung 100fach
Ölimmersion

8. Literatur

8. Literatur

- 1) Erwin Amlacher
Autoradiographie in Histologie und
Cytologie
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 1974
- 2) Helpap, B. und Maurer, W.
Bemerkungen zu autoradiographischen
Untersuchungsmethoden von Exisitions-
geweben in-vitro mit H^3 -Thymidin
Verh. dtsch. Ges. Path. 51, 262, 1967
- 3) Hilscher, W. und Maurer, W.
Autoradiographische Bestimmungen der
Dauer der DNS-Verdopplung und ihres
zeitlichen Ablaufs bei Spermatogonien
der Ratte durch Doppelmarkierungen
mit C^{14} - und H^3 -Thymidin
Naturwissenschaften 49, 352 1962
- 4) Hinrichs, H.R. Petersen, R.O. Baserga, R.
Inkorporation of thymidin into DNA of
mouse organs
Arch. Path. 78, 245, 1964
- 5) Hollweg, Susanne
Autoradiographische Bestimmung der Dauer
der DNS-Verdopplung und des Generations-
zyklus sowie der anderen Teil-Phasen des
Zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte
Med. Diss., Köln, 1966

- 6) Maidhof, R., Prantl, F., Hornstein, O.P.
und Schell, H.
Zur Proliferationskinetik der normalen
und leukoplakischen Wangenmucosa
Arch. Derm. Res. 260, 193-200, 1977

- 7) Oehlert, W.
Die Steuerung und Regeneration im
mehrschichtigen Plattenepithel
Verh. dtsch. Ges. Path. 50, 90-118, 1966

- 8) Romeis, Benno
Mikroskopische Technik
R. Oldenbourg-Verlag, München, Wien 1968

- 9) Schmid, G.H., Schell, H., Hornstein, O.P.
Fischer, U. und Stosiek, C.
Untersuchungen über die Dauer der DNS-
Synthesephase in der Wangenschleimhaut
der männlichen Ratte
Virchows Arch. B Cell Path. 17, 177-184
Springer-Verlag 1974

- 10) Schrader, Franz
Mitose
Verlag Franz Deuticke, Wien 1954

- 11) Schultze, Brigitte
Die Orthologie und Pathologie des Nuclein-
säure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle
im Autoradiogramm
Handbuch der allg. Path., Bd. 2, 466-670
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 1968

- 12) Squier, C.A., Johnson, N.W. and Hopps, R.
 Human oral mucosa
 Development, Structure and Function
 Blackwell Scientific Publications
 Oxford, London, Edinburgh, Melbourne 1975

- 13) Stanka, Peter
 Ultrastruktur der Zelle, allgemeine
 Zytologie und Histologie
 Rathgeber-Verlag München 1977

- 14) Karring, T., Lang, N.P. and L  e, H.
 Role of connective tissue in determining
 epithelial specificity
 I. dent. Res. 51, 1303 1972

- 15) Karring, T., Lang, N.P. and L  e, H.
 The role of gingival connective tissue in
 determining epithelial differentiation
 I. periodont. Res. 10, 1 1975

- 16) Karring, T., Gunning, B.R., Oliver, R.C.
 and L  e, H.
 The origin of granulation tissue and its
 impact on postoperative results of muco-
 gingival surgery
 I. periodont 46, 577 1975

- 17) Flores de Jacoby, L. and Fromme, H.G.
 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an
 gestielten Alveolarmucosatransplantaten und
 des auf dem Periost neugebildeten Epithels
 Dtsch. zahnärztl. Z., 33, 43-51, 1979

Die vorliegende Untersuchung wurde durch
den Minister für Wissenschaft und Forschung
des Landes Nordrhein-Westfalen finanziell
gefördert.

Herrn Prof. Dr. Harforth danke ich für die Überlassung des Themas sowie seine Bereitschaft zur Diskussion und für seine vielfältigen Anregungen beim Abfassen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Hilscher, Leiter der Abteilung für Experimentelle Pathologie am Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung, danke ich für das Entgegenkommen, in seiner Abteilung die Autoradiogramme anfertigen zu lassen.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Betzner, Frau Rehbein und Frau Horn für die Hilfe bei der Herstellung der Schnitte, Autoradiogramme und Fotos.

Lebenslauf

Am 10. Oktober 1948 wurde ich als erstes von 7 Kindern der Eheleute Ewald Etzbach und seiner Frau Waltraud Etzbach, geb. Lischke, in Bad Honnef/Rhein geboren.

Dort besuchte ich die kath. Volksschule an der Bergstraße von April 1955 bis Dezember 1959.

Im Dezember 1959 zogen wir nach Duisburg um. Dort besuchte ich von Januar 1960 bis April 1960 die kath. Volksschule an der Sandstraße. Von April 1960 bis März 1966 besuchte ich das Leibniz-Gymnasium in Duisburg-Hamborn, das ich im März 1966 verließ, um einen Beruf zu erlernen.

Von April 1966 bis September 1969 erlernte ich den Beruf des Starkstromelektrikers (Steinkohlenbergbau). Die Lehre schloß ich im September 1969 mit der Facharbeiterprüfung ab.

Nach der Lehre arbeitete ich auf der Schachtanlage Friedrich Thyssen 2/5 in Duisburg-Hamborn als Elektrohauer unter Tage von Oktober 1969 bis Oktober 1971.

Bereits während der Lehre begann ich auf einer privaten Abendschule, dem Lehrinstitut Zimmermann in Duisburg, mit den Vorbereitungen zum Abitur.

Im März 1971 bestand ich die Nichtschülerreifeprüfung.

Im Wintersemester 1971/72 immatrikulierte ich mich an der Ruhruniversität Bochum für das Lehramt an berufsbildenden Schulen, Fächer Elektrotechnik und Chemie.

Im April 1972 wurde ich zur Bundeswehr eingezogen und leistete bis Juni 1973 meinen Wehrdienst.

Zum Wintersemester 1973/74 immatrikulierte ich mich an der Universität Düsseldorf im Fach Zahnmedizin.

Im Frühjahr 1976 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung ab und bestand im September 1978 die zahnärztliche Prüfung.

Die Bestallung als Zahnarzt erhielt ich im Oktober 1978.

Seit Oktober 1978 arbeite ich als Ausbildungsassistent in freier Praxis.

Seit dem 13.6.1979 bin ich mit Susanne Etzbach, geb. Roland, verheiratet.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791